



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 9/16, 9/50, 9/51</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/03450</b>
			(43) Date de publication internationale: 28 janvier 1999 (28.01.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01502 (22) Date de dépôt international: 10 juillet 1998 (10.07.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/08968                      15 juillet 1997 (15.07.97)      FR 08/944,047                  9 septembre 1997 (09.09.97)      US (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COLETICA [FR/FR]; 32, rue Saint Jean de Dieu, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PERRIER, Eric [FR/FR]; Quartier Saint Martin, F-38138 Les Côtes d'Arey (FR). LEVY, Marie-Christine [FR/FR]; 18 ter, rue Houzeau-Muiron, F-51100 Reims (FR). LACAZETTE, Patricia [FR/FR]; 43, Les Peupliers, F-01390 Saint André de Corcy (FR). BUFDEVANT, Chantal [FR/FR]; Les Carrés, F-69390 Millery (FR). (74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).		(81) Etats désignés: JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: CROSS-LINKED PLANT PROTEIN PARTICLES, IN PARTICULAR MICROPARTICLES OR NANOPARTICLES, PREPARATION METHOD AND COSMETIC, PHARMACEUTICAL OR FOOD COMPOSITIONS CONTAINING SAME (54) Titre: PARTICULES, EN PARTICULIER MICRO- OU NANOPARTICULES DE PROTEINES VEGETALES RETICULEES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITIONS COSMETIQUES, PHARMACEUTIQUES OU ALIMENTS EN CONTENANT (57) Abstract <p>The invention concerns particles, characterised in that they comprise at least on their surface, a wall formed by cross-linked plant proteins, in particular resulting from interface cross-linking between plant proteins and an acylating polyfunctional cross-linking agent, comprising at least two acylating groups, producing covalent bonds between the protein functions capable of being acylated and the polyfunctional acylating cross-linking agent acyl radical groups. Said particles are used for making a cosmetic, pharmaceutical, dermatological or food composition.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne des particules. Ces particules sont caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins en surface une paroi formée de protéines végétales réticulées, en particulier au moyen d'une réticulation interfaciale entre les protéines végétales et un agent réticulant polyfonctionnel acylant, comprenant au moins deux groupes acylants, réalisant des liaisons covalentes entre les fonctions acylables des protéines et les groupements acyles de l'agent réticulant polyfonctionnel acylant. Ces particules sont utilisées pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmaceutique, dermatologique ou alimentaire.</p>			

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

Particules, en particulier micro- ou nanoparticules de protéines végétales réticulées, leur procédé de préparation et compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires en contenant.

5           La présente invention concerne essentiellement des particules, en particulier micro- ou nanoparticules de protéines végétales réticulées, leur procédé de préparation et compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires en contenant.

10    ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE

Il est bien connu que l'encapsulation de substances actives offre des avantages importants tels que par exemple la protection de la substance ou sa libération lente ou différée au site d'utilisation.

15           Pour des applications dans les domaines cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires, les matériaux les plus recherchés comme constituants de la paroi sont des substances naturelles, en particulier les protéines ou les polysaccharides, en raison de leur biocompatibilité.

20           Certains procédés de microencapsulation utilisant les protéines ou les polysaccharides découlent de la méthode de polycondensation interfaciale décrite par Chang (Chang T.M.S., Science, 1964, 146, 524-525). Selon cette méthode bien connue, on émulsionne une solution aqueuse d'une diamine dans une phase hydrophobe, puis on ajoute une solution d'un chlorure de diacide à l'émulsion. Les groupements aminés forment des liaisons amide avec le dichlorure d'acide à l'interface, ce qui donne une membrane individualisant des microcapsules. On sait  
25           que la réaction de polycondensation est favorisée par l'alcalinisation de la phase aqueuse car la réaction libère de l'acide chlorhydrique, lequel en l'absence d'agent alcalin, protone une partie des groupements aminés les rendant ainsi non acylables.

30           Il en est de même lorsque la diamine est remplacée par une protéine, pour former des microcapsules de protéine réticulée. Dans les procédés décrits dans la littérature antérieure, la solution aqueuse initiale de protéine est alcalinisée de manière à ce que tous les groupements aminés libres de la protéine soient sous forme non protonée, acylable. Ainsi par exemple, le document LEVY US-4,780,321 concerne la préparation de microcapsules à parois mixtes formées de  
35           polysaccharides et protéines réticulées. La solution aqueuse initiale de

polysaccharide et protéine est alcaline, et de préférence d'un pH > 10. De même dans le document HUC 5,395,620, qui concerne des microcapsules à paroi d'atélocollagène et glycosaminoglycannes réticulés, le pH de la solution aqueuse initiale est de préférence basique, tous les exemples de ce brevet utilisant un  
5 tampon carbonate de pH 9,8.

Dans le document Mars FR-A-2-444 497, on utilise une solution aqueuse de protéine sans addition de substances alcalines ou tampons. Cependant, la phase aqueuse contient une forte concentration en protéine, au moins égale à 20% (p/p), de telle manière qu'une partie serve à neutraliser l'HCl formé (rôle de  
10 tampon), tandis que la fraction non protonée est utilisable pour la formation de la membrane.

Le glutaraldéhyde peut être également utilisé pour la fabrication de particules à partir de protéines. La réticulation est en général effectuée en milieu neutre ou alcalin. Ainsi par exemple la sérumalbumine peut être réticulée en  
15 solution à 20 % dans un tampon phosphate de pH 7,5 (Sheu M.T. et al., J. Parenter. Sci. Technol., 1986, 40, 253-258) avec 1 % de glutaraldéhyde. Cependant le mécanisme de la réaction du glutaraldéhyde avec les protéines est complexe et reste mal élucidé. On sait que la réaction fait intervenir non seulement le glutaraldéhyde libre mais aussi des formes polymères provenant de la  
20 condensation du glutaraldéhyde sur lui-même, ces dérivés pouvant exister sous forme linéaire ou cyclique. La composition des solutions de glutaraldéhyde en ces différentes formes réactives est variable et dépend de divers facteurs, si bien que la nature des liaisons formées et le degré de réticulation ne sont pas complètement contrôlés, ce qui est un obstacle au développement industriel (Saleh A.M. et al.,  
25 Int. J. Pharm., 1989, 57, 205-210). Par ailleurs, cet agent réticulant très réactif peut interférer avec divers principes actifs et diminuer ainsi leur biodisponibilité (Gupta P.K et Hung C.T., J. Microencapsulation, 1989, 6, 427-462). Enfin, des groupements aldéhyde libres peuvent être présents sur les particules (Magee G.A. et al., J. Controlled Release, 1995, 37, 11-19). La présence de tels groupements  
30 réactifs sur des particules destinées à l'utilisation humaine n'est pas souhaitable. Par exemple, des effets toxiques de particules vides ont été observés sur des macrophages (Suunders J. et al., Int. J. Pharm., 1991, 68, 265-270).

Les protéines citées dans les documents de la littérature antérieure sont des protéines animales, aucun ne mentionnant l'utilisation de protéines végétales.

Si l'on applique à des préparations de protéines végétales disponibles dans le commerce, les conditions décrites dans les documents antérieurs où la phase aqueuse utilisée pour dissoudre lesdites protéines végétales est un tampon au carbonate de sodium de pH = 9,8, il n'est pas possible d'obtenir des microcapsules stables. Les microcapsules sont obtenues en très faible quantité. Elles ont une membrane fragile : une partie d'entre elles apparaît souvent ouverte à l'examen microscopique. Elles forment de nombreux agrégats et se détériorent très rapidement en quelques jours à 45°C, à l'état de suspension aqueuse. Il en est de même lorsqu'on utilise pour dissoudre les protéines végétales des tampons phosphate de pH compris entre 7 et 8, ou simplement de l'eau distillée.

De même, on n'obtient pas de microcapsules stables si l'on utilise directement des préparations liquides contenant des protéines végétales telles que des laits de soja du commerce sans les tamponner, ou si on les tamponne par ajout de carbonate de sodium ou de phosphate de sodium.

15

#### RESUME DE L'INVENTION

De manière parfaitement inattendue, il a été découvert que si l'on utilise, pour préparer les particules, des solutions de protéines végétales de pH proches de la neutralité ou même légèrement acides, c'est-à-dire dans un domaine de pH allant d'environ 4,5 à environ 8, et contenant au moins un sel d'acide carboxylique, en particulier un sel alcalin ou alcalino-terreux, de préférence un sel alcalin, on peut alors préparer des particules, en particulier des micro-ou nanoparticules stables de protéines végétales réticulées. De telles solutions de protéines végétales peuvent être obtenues, ou bien en utilisant des solutions tampons contenant lesdits sels, pour extraire les protéines contenues dans des préparations de protéines végétales pulvérulentes, ou bien en ajoutant lesdits sels à des préparations liquides contenant des protéines végétales telles que des laits de soja du commerce.

Ce résultat est d'autant plus inattendu que les pH de ces solutions sont peu élevés et que les concentrations en protéines dissoutes dans la phase aqueuse sont faibles, toujours inférieures à environ 5 % en poids.

#### BUTS DE L'INVENTION

Ainsi, la présente invention a principalement pour objet de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant

de préparer des particules, en particulier des micro- ou nanoparticules, des micro- ou nanocapsules, des micro- ou nanosphères, stables à partir de protéines végétales.

5 La présente invention a encore pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de préparer des particules, en particulier des micro- ou nanoparticules, des micro- ou nanocapsules, des micro- ou nanosphères, stables à partir de protéines végétales, tout en permettant éventuellement l'encapsulation d'une ou plusieurs substances actives à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion.

10 La présente invention a encore pour but de résoudre les nouveaux problèmes techniques énoncés ci-dessus avec l'utilisation de procédés de fabrication simples, utilisables à l'échelle industrielle, en particulier dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique, alimentaire. De préférence, cette solution doit permettre de préparer des particules ayant une taille de particule réglable à  
15 volonté, en particulier dans une plage de dimensions allant du nanomètre à quelques millimètres, en particulier d'environ 10 nanomètres à environ 3 mm.

#### DESCRIPTION SUCCINCTE DE L'INVENTION

20 Dans le cadre de l'invention, on entend par particule, une particule de forme essentiellement sphérique, qui peut avoir ou bien une structure vésiculaire, ou bien une structure homogène. Les particules comprennent donc toute sphère ou capsule. Pour les particules de structure vésiculaire, comportant un revêtement externe distinct formant une membrane autour du contenu, on parle généralement de capsules, et, en particulier de micro-ou de nano-capsules dans le cas d'une  
25 dimension de l'ordre du micromètre ou du nanomètre respectivement. Pour les particules de structure homogène, monolithique, on parle habituellement de sphères, et, en particulier de micro- ou de nano-sphères dans le cas d'une dimension de l'ordre du micromètre ou du nanomètre respectivement. L'ensemble de ces particules fait partie intégrante de la présente invention.

30 De préférence également, cette solution doit permettre de préparer des particules biocompatibles et biodégradables.

Ainsi, selon la présente invention, il a été découvert de manière parfaitement inattendue que l'on pouvait obtenir des particules stables en déclenchant une réaction de réticulation interfaciale entre des protéines végétales  
35 et un agent réticulant acylant polyfonctionnel en particulier un halogénure de

diacide de préférence un chlorure de diacide, à l'interface des phases d'une émulsion, en particulier de type "eau-dans-huile" ou "huile-dans-eau".

5 Dans le cas d'une émulsion de type "eau-dans-l'huile", selon un premier mode de réalisation de l'invention, on émulsionne tout d'abord une phase aqueuse contenant les protéines végétales et au moins un sel d'acide carboxylique, dans une phase hydrophobe, puis on ajoute la solution d'agent réticulant à l'émulsion. On constate alors qu'il se forme à l'interface des gouttelettes aqueuses des membranes constituées de molécules réticulées de la protéine végétale.

10 Les particules sont suffisamment stables pour résister à une incubation prolongée à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse sans destruction de leur structure.

Les particules sont rapidement lysées en présence d'une protéase, ce qui démontre leur biodégradabilité.

15 Selon les conditions choisies pour l'émulsification, la taille des particules peut varier de moins de 1 micron, c'est-à-dire être de taille nanométrique, par exemple en utilisant un homogénéiseur haute pression, à plusieurs centaines de micromètres ou même un ou plusieurs millimètres.

20 Il a été également découvert que l'on peut obtenir des particules, en particulier des capsules, de protéines végétales réticulées de grande taille, dont la taille moyenne dépasse 500  $\mu\text{m}$ , une fraction de ces particules pouvant avoir un diamètre dépassant le millimètre. Il faut pour cela disperser la phase aqueuse contenant les protéines végétales et au moins un sel d'acide carboxylique, au sein d'une phase hydrophobe en utilisant des conditions d'agitation douce, éventuellement sans tensioactif, de manière à obtenir des gouttelettes dispersées de taille convenable. On procède ensuite à l'ajout de l'agent réticulant de manière à former la membrane de protéines réticulées.

25 Il a été également découvert que l'on peut augmenter le diamètre moyen des particules et la proportion de particules de taille supérieure au mm en incorporant à la phase aqueuse, ou à la phase hydrophobe, ou à l'une et l'autre phase, avant de procéder à l'émulsification, une petite quantité d'une substance insoluble et lipophile telle que par exemple de l'oxyde de titane, ou de l'oxyde de zinc, ou du talc, ou du stéarate de calcium, ou encore un colorant insoluble sous forme de pigment ou de laque.

30 Il a été également découvert que l'on pouvait obtenir des particules en déclenchant la réaction de réticulation au sein d'une émulsion de type "huile-dans-

eau". Dans ce cas, on émulsionne une phase hydrophobe contenant un agent réticulant polyfonctionnel à au moins deux groupes acylants, de préférence un halogénure de diacide, en particulier un chlorure de diacide, au sein d'une phase aqueuse contenant des protéines végétales et au moins un sel d'acide carboxylique, et utilisée comme phase dispersante. On laisse la réaction se développer à l'interface et on maintient l'agitation pendant un temps convenable. On constate qu'il se forme une membrane autour des gouttelettes hydrophobes dispersées, donnant ainsi des particules à contenu hydrophobe, ici constituant en des capsules.

C'est ainsi qu'à partir de diverses préparations pulvérulentes de protéines végétales disponibles dans le commerce telles que des farines, des concentrats ou des isolats, on peut obtenir des solutions convenables en utilisant des tampons renfermant par exemple de l'acétate de sodium, ou du succinate de sodium, ou du citrate de sodium. Pour préparer les solutions de protéines végétales, on disperse un échantillon de la farine, ou du concentrat ou de l'isolat, dans la solution tampon, et on met en place une agitation, en s'aidant éventuellement d'un chauffage à température modérée, par exemple comprise entre 30 et 50°C. Après un temps convenable, généralement compris entre 5 min et 30 min, on élimine la fraction insoluble, par exemple par centrifugation. Le surnageant contenant les protéines végétales en solution dans le tampon, est alors utilisé comme phase aqueuse, pour préparer des particules par réticulation interfaciale au moyen d'agents réticulants, en particulier des halogénures de diacides.

De même, l'addition d'au moins un sel alcalin d'un acide carboxylique tel que l'acétate de sodium ou le citrate de sodium à des préparations liquides de protéines végétales telles que les laits de soja, donne une phase aqueuse permettant d'obtenir des particules stables à partir de ces laits.

Il a été également découvert que l'on pouvait obtenir des particules de protéines végétales réticulées de très petite taille, inférieure au micromètre, de taille intermédiaire, micrométrique, ou de grande taille, c'est-à-dire ayant un diamètre proche du millimètre ou même dépassant le millimètre et présentant une stabilité et une résistance mécanique élevées. Le diamètre moyen de ces particules, ici des microcapsules ou des capsules, peut dépasser 500  $\mu\text{m}$  et même atteindre 800 à 900  $\mu\text{m}$ , une fraction des particules ayant alors un diamètre dépassant le millimètre.

De telles particules de grande taille peuvent être obtenues par exemple en émulsionnant une phase aqueuse contenant les protéines végétales et au moins un sel alcalin d'un acide carboxylique, au sein d'une phase hydrophobe, dans des conditions compatibles avec l'obtention de gouttelettes dispersées de taille  
5 convenable, notamment en utilisant des conditions d'agitation douces, et éventuellement en supprimant l'addition d'un tensioactif. On obtient alors, de manière surprenante, des vésicules visibles à l'oeil nu, dont la membrane est élastique et résiste à la pression, et qui restent stables pendant des temps prolongés à la température de 45°C à l'état de suspension aqueuse.

10 De plus, il a été découvert que, dans des conditions données, y compris dans les conditions ci-dessus donnant des particules, microcapsules ou capsules, de diamètre moyen dépassant 500  $\mu\text{m}$ , l'on peut augmenter le diamètre moyen des particules et la proportion des particules de diamètre supérieur à 1 mm, en incorporant à la phase aqueuse, ou à la phase hydrophobe, ou à l'une et l'autre  
15 phase, avant de procéder à l'émulsification, une petite quantité d'une substance insoluble et lipophile telle que par exemple de l'oxyde de titane, ou de l'oxyde de zinc, ou du stéarate de calcium, ou encore un colorant insoluble sous forme de pigment ou de laque. Lors du stade d'émulsification, la substance insoluble lipophile se place à l'interface huile/eau et stabilise ainsi les grosses gouttelettes,  
20 ce qui permet une réticulation interfaciale autour de ces grosses gouttelettes, lors de l'addition ultérieure de l'agent réticulant. Une membrane est ainsi formée donnant des particules de taille augmentée, ici en particulier des capsules et notamment des microcapsules ou des capsules ayant une dimension de l'ordre du millimètre pouvant même atteindre 2 mm ou 3 mm.

25 Les particules obtenues sont parfaitement visibles à l'oeil nu et, selon la nature de la substance insoluble lipophile utilisée, se présentent comme des vésicules de couleur blanche ou bien de la couleur de la substance colorée.

L'accès à des particules stables et solides d'une grande taille et éventuellement colorées représente un progrès technique important. Par exemple,  
30 le fait que les particules soient parfaitement visibles permet une vérification aisée de l'homogénéité des mélanges renfermant ces particules lorsqu'on les utilise à l'état de dispersion dans divers milieux. Les contrôles de stabilité des préparations qui les renferment sont également facilités.

### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Selon un premier aspect, la présente invention couvre des particules caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins en surface une paroi formée de protéines végétales réticulées, en particulier au moyen d'une réticulation  
5 interfaciale entre les protéines végétales et un agent réticulant polyfonctionnel acylant, comprenant au moins deux groupes acylants, réalisant des liaisons covalentes entre les fonctions acylables des protéines et les groupements acyles de l'agent réticulant polyfonctionnel acylant.

Les fonctions acylables des protéines sont notamment les fonctions  
10 amine, les groupements hydroxyle, thiol, carboxylate.

Dans le cadre de l'invention, toute protéine végétale peut être utilisée sans limitation. De même, tout agent réticulant polyfonctionnel à au moins deux fonctions acylantes peut être utilisé sans limitation.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les protéines  
15 végétales précitées sont extraites notamment de légumineuses, en particulier des plantes suivantes : lupin (genre *Lupinus*), soja (genre *Glycine*), pois (genre *Pisum*), pois chiche (*Cicer*), la luzerne (*Medicago*), fève (*Vicia*), lentille (*Lens*), haricot (*Phaseolus*), du colza (*Brassica*), ou du tournesol (*Helianthus*), ou encore de céréales comme le blé, le maïs, l'orge, le malt, l'avoine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les  
20 protéines végétales précitées sont utilisées sous forme de préparations pulvérulentes telles que des farines, des concentrats, des isolats, ou de préparations liquides telles que des laits de soja.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la  
25 solution aqueuse utilisée pour dissoudre les protéines végétales contenues dans les préparations pulvérulentes est une solution aqueuse tampon de pH compris entre environ 4,5 et environ 8.

Cette solution de pH compris entre environ 4,5 et environ 8 est de  
préférence obtenue avec un sel d'un acide carboxylique, en particulier un sel  
30 alcalin ou alcalino-terreux d'un acide carboxylique. De préférence, on utilise un sel alcalin d'un acide carboxylique, en particulier un sel de sodium ou de potassium, de préférence de sodium, à une concentration en poids comprise entre 0,1% et 20%.

L'acide carboxylique précité peut comporter un seul groupement  
35 carboxylique ou plusieurs de ces groupements. Les acides carboxyliques

utilisables sont notamment les acide acétique, oxalique, malonique, succinique, glutarique, diméthylglutarique, adipique, fumarique, maléique, tartrique, malique, citrique, lactique, salicylique.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la concentration de protéine végétale dans la phase aqueuse est comprise entre 0,5 et 5 % en poids.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la quantité de sel d'acide carboxylique à ajouter aux préparations liquides de protéines végétales telles que le lait de soja est comprise entre 0,1 % et 20 %, mieux entre 5 et 15 %, mieux d'environ 10 % en poids.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la substance insoluble lipophile à incorporer à la phase aqueuse ou à la phase hydrophobe, ou à l'une et l'autre phase, pour augmenter la taille des particules, est choisie de préférence parmi le groupe des sels insolubles d'acides gras et de métaux bivalents, comme le stéarate de calcium ou de magnésium, ou de talc, ou des oxydes métalliques tels que l'oxyde de titane, ou l'oxyde de zinc, ou des substances colorées insolubles sous forme de pigments tels que le DC Red 30, ou sous la forme de laques de calcium, d'aluminium, de baryum, ou de zirconium de divers colorants. Cette substance insoluble lipophile peut aussi être présente dans  
20 la masse des particules et/ou adsorbée à la surface de ces particules.

Comme exemples de sels insolubles d'acides gras utilisables, on citera les sels de calcium, magnésium, strontium, baryum d'acides carboxyliques à nombre de carbones égal ou supérieur à 12, tels que les acides laurique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique.

25 Comme exemples de laques utilisables, on citera : l'indigocarmin aluminium lake (de couleur bleue), le Ponceau 4 R aluminium lake (rouge), le Sunset yellow FCF aluminium lake (orange).

30 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la quantité de ladite substance insoluble lipophile à incorporer à la phase aqueuse ou à la phase hydrophobe, ou à l'une et l'autre phase, pour augmenter la taille des particules, est comprise entre 0,01 % et 2 % en poids de la phase concernée.

35 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'agent réticulant polyfonctionnel acylant précité est de préférence constitué par un dihalogénure d'acide ou un dianhydride d'acide. Comme dihalogénure d'acide celui-ci peut être choisi parmi le groupe consistant de dihalogénure de phtaloyle,

de téréphtaloyle, de sébacoylole, de glutaryle, d'adipoyle ou de succinyle. On préfère utiliser un dichlorure de ces acides.

Selon un second aspect, la présente invention couvre aussi l'utilisation de ces particules pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmaceutique et notamment dermatologique, ou alimentaire.

Selon un troisième aspect, la présente invention couvre encore une composition cosmétique, pharmaceutique, notamment dermatologique, ou alimentaire contenant de telles particules.

Dans ces compositions, la proportion d'incorporation des particules de l'invention pourra varier dans de larges limites et sera, de préférence, comprise entre 0,01 et 10 % en poids par rapport au poids total de la composition finale.

Selon un quatrième aspect, la présente invention couvre encore un procédé de fabrication de particules précitées à paroi formée de protéines végétales réticulées, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la formation d'une solution aqueuse de pH compris entre environ 4,5 et environ 8 contenant en solution au moins une protéine végétale, et au moins un sel d'acide carboxylique ;
- b) la formation d'une phase huileuse ;
- c) la formation d'une émulsion par mélange sous agitation de la phase aqueuse et de la phase huileuse ci-dessus ;
- d) la réticulation interfaciale de ladite protéine végétale à l'aide d'un agent réticulant polyfonctionnel acylant à au moins deux groupes acylants pendant une période de temps suffisante pour obtenir des particules comprenant au moins en surface des parois formées de protéines végétales réticulées par ledit agent réticulant ; et
- e) si désiré, la séparation des particules ainsi préparées.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la solution aqueuse précitée est préparée à partir de préparations pulvérulentes de protéines végétales, en utilisant un tampon de pH compris entre environ 4,5 et environ 8 contenant un sel d'acide carboxylique à une concentration en poids généralement comprise entre 0,1 et 20 %. Les sels d'acides carboxyliques utilisés pour fabriquer la solution aqueuse tampon ont été décrits précédemment.

Comme tampon actuellement préféré, on pourra utiliser un tampon obtenu à l'aide d'un acide carboxylique, de préférence biocompatible, par exemple choisi parmi le groupe consistant d'un acétate, d'un succinate, d'un citrate.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la solution aqueuse précitée est obtenue à partir d'une préparation liquide de protéines végétales par ajout d'un sel d'acide carboxylique à une concentration en poids comprise entre 0,1% et 20%.

5            Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'agent réticulant polyfonctionnel précité est choisi parmi un dihalogénure d'acide ou un dianhydride d'acide. Comme indiqué précédemment, le dihalogénure est de préférence un dichlorure et on utilisera de préférence un acide parmi la liste précédemment indiquée.

10           Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le rapport du poids d'agent réticulant au poids de protéine utilisé est compris entre 0,03 et 70 parties en poids d'agent réticulant pour une partie en poids de protéine. La réaction de réticulation interfaciale est avantageusement réalisée à une température comprise entre 4 et 80°C, de préférence entre 15 et 30°C, et à pression atmosphérique .

15           Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, on utilisera pour former la phase huileuse, de préférence soit un solvant organique qui peut être facilement éliminé tel que le cyclohexane ou un mélange chloroforme/cyclohexane en particulier à un rapport 1:4 v/v, soit de préférence  
20           une huile biocompatible, en particulier une huile végétale ou minérale, ou un ester, ou un mélange d'esters d'acide gras, en particulier une huile de coco, le cocoate d'éthyle-2-hexyle.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, on réalisera un procédé en émulsion de type eau-dans-huile.

25           Selon un autre mode de réalisation, on réalisera un procédé en émulsion de type huile-dans-eau.

Dans le cadre de l'un quelconque des procédés de l'invention, on pourra utiliser avantageusement un agent tensioactif pour faciliter ou stabiliser l'émulsion, choisi parmi un agent tensioactif bien connu à l'homme de l'art. On  
30           utilisera, dans le cadre de l'invention, de préférence un tensioactif de type ester de sorbitol tel que le sorbitan trioléate commercialisé sous le nom commercial de Span 85® de la société ICI.

D'autre part, dans le cadre de l'invention, on pourra utiliser un additif insoluble tel qu'un pigment pour obtenir de grandes particules, en particulier des  
35           capsules c'est-à-dire ayant une taille au moins égale à environ 1 mm ou même 2 ou

3 mm. A titre d'additif particulièrement intéressant dans le cadre de l'invention, on peut citer, sans limitation, des oxydes métalliques tels que l'oxyde de titane, de l'oxyde de zinc, du talc, des substances colorées insolubles sous forme de pigments ou de laques.

5 Dans le cadre de l'invention, on peut ainsi obtenir des particules ayant une dimension réglable à volonté depuis les plus petites tailles jusqu'aux grandes tailles, c'est-à-dire de taille nanométrique jusqu'à de grandes tailles supérieures à 1 mm, c'est-à-dire pouvant aller jusqu'à environ 2 mm ou même 3 mm. L'invention inclut aussi dans la définition des "particules", des capsules ou des  
10 sphères, donc notamment des nanocapsules ou nanosphères et des microcapsules ou des microsphères.

Egalement, les particules obtenues dans le cadre de l'invention, en particulier les microcapsules, nanocapsules ou capsules, peuvent être indifféremment à contenu aqueux ou huileux, et présentent un aspect satisfaisant.  
15 Elles sont solides, faciles à disperser dans divers milieux hydrophiles ou lipophiles. Les particules selon l'invention sont stables à 45°C, à l'état de suspension aqueuse, qu'elles soient à contenu aqueux ou à contenu huileux.

On peut également incorporer dans le cas des procédés de l'invention diverses substances en suspension, par exemple des pigments, ou en solution,  
20 comme par exemple un sucre tel que le glucose, ou en émulsion, par exemple telle qu'une huile, en particulier une huile de paraffine.

Les particules selon l'invention sont également biodégradables car elles peuvent être lysées rapidement par une enzyme telle que la trypsine ou autre enzyme bien connue à l'homme de l'art.

25 Pour la fabrication de nanoparticules, nanosphères ou nanocapsules, on pourra utiliser le procédé décrit dans la demande antérieure du déposant FR-A-2 683 159 = WO 93/08908.

On comprend que l'invention permet de réaliser des particules, en particulier des sphères ou des capsules, telles que nanosphères ou nanocapsules,  
30 microsphères ou microcapsules, qui permettent d'encapsuler des substances, en particulier des principes actifs, dont les principes actifs lipophiles tels que huile végétale, minérale, ou synthétique, des dérivés de vitamine A et de vitamine E, etc., ainsi que des principes actifs hydrophiles tels que des extraits végétaux, l'acide ascorbique ou vitamine C, PMG, glucose, des pigments organiques et  
35 pigments minéraux.

La stabilité de ces particules sous différentes conditions a pu être observée à des températures allant de 4°C à 90°C, pour des pH allant de 3 à 11. Ainsi une stabilité de durée supérieure à 6 mois à 45°C, a pu être observée, que ce soit en milieu sec ou hydraté.

- 5           La biodégradabilité des particules a été démontrée à l'aide de différentes enzymes, ces enzymes pouvant être la trypsine, la chymotrypsine ou une autre protéase.

Ces particules sont également parfaitement biocompatibles et ne procurent aucune irritation cutanée, oculaire, aucune toxicité orale.

- 10           Les particules selon l'invention peuvent être utilisées, quelle que soit leur taille, dans des compositions cosmétiques pour réaliser des formulations de type émulsion eau-dans-huile ou huile-dans-eau, ou des gels hydrophiles, des gels hydrophobes, des shampooings et des gels douche.

- 15           Ainsi, comme il a été dit précédemment, ces particules ou capsules peuvent être utilisées pour préparer des compositions cosmétiques, pharmaceutiques, notamment dermatologiques, ou alimentaires en les combinant à divers ingrédients actifs ou excipients bien connus de l'homme de l'art.

- 20           D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à l'aide des exemples suivants donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Les exemples font partie intégrante de l'invention. Ainsi, toute caractéristique qui apparaît être nouvelle par rapport à un état de la technique quelconque fait partie intégrante de l'invention dans sa fonction et sa caractéristique générale. Dans les exemples, les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire. En  
25           outre, la température est la température ambiante ou bien est exprimée en degré celsius, sauf indication contraire. La pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

- 30           Exemple 1 de l'invention : Préparation de microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées

*a) Préparation de la phase aqueuse :*

On disperse 0,75 g de farine de lupin (*Farine ultra-fine de lupin blanc doux* (CANA) à 45% de protéines) dans 15 ml de tampon acétate pH 7,4. On agite

sous agitation magnétique pendant 10 min, puis on centrifuge et on sépare le surnageant.

*b) Emulsification*

- 5                    On disperse 6 ml du surnageant dans 30 ml de cyclohexane à 2% de sorbitan trioleate (Span 85®) par agitation de 5 min à 2000 rpm.

*c) Réticulation*

- 10                    On ajoute 40 ml d'une solution de chlorure de téréphtaloyle à 5% (p/v) dans un mélange de chloroforme : cyclohexane (1:4 v/v). Après agitation de 30 min, les microcapsules sont séparées par centrifugation puis lavées par remise en suspension dans du cyclohexane, puis dans l'alcool additionné de 2% de polysorbate, dans l'alcool à 95%, puis dans l'eau.

- 15                    On obtient un sédiment blanc. L'examen microscopique montre de belles microcapsules sphériques, transparentes, très légèrement piquetées, à membrane nette et régulière, solides, de taille comprise entre 20 et 50 µm.

Les microcapsules sont intactes après 5 mois de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

- 20                    Exemple 2 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées

- Le protocole de l'exemple 1 est reproduit en remplaçant le tampon acétate de pH 7,4 par un tampon acétate de pH 6,8. On obtient également un sédiment blanc formé de belles microcapsules sphériques, solides, de taille  
25                    comprise entre 20 et 60 µm. Les microcapsules sont intactes après 16 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 3 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées

- 30                    Le protocole de l'exemple 1 est reproduit en remplaçant le tampon acétate de pH 7,4 par un tampon acétate de pH 5,9. On obtient également un sédiment blanc formé de belles microcapsules sphériques, solides, de taille comprise entre 20 et 60µm. Les microcapsules sont intactes après 16 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 4 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées

Le protocole de l'exemple 1 est reproduit en remplaçant le tampon acétate de pH 7,4 par un tampon succinate pH 6. On obtient de belles microcapsules sphériques, solides, de taille comprise entre 10 et 50 µm. Les microcapsules sont intactes après 16 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 5 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées

Le protocole de l'exemple 1 est reproduit en remplaçant le tampon acétate de pH 7,4 par un tampon citrate pH 6. On obtient de belles microcapsules sphériques, solides, de taille comprise entre 20 et 60 µm. Les microcapsules sont intactes après 15 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 6 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de pois réticulées

Le protocole de l'exemple 1 est reproduit en utilisant, au lieu de farine de lupin, un isolat de protéines de Pois (à 90% de protéines : Pisane HD®, COSUCRA). On obtient de belles microcapsules sphériques, solides, de taille comprise entre 20 et 70 µm. Les microcapsules sont intactes après 4 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 7 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de féverole réticulées

Le protocole de l'exemple 1 est reproduit en utilisant, au lieu de farine de lupin, un concentrat de protéines de Féverole (à 50% de protéines : Concentrat 50®, Gemef Industrie). On obtient de belles microcapsules sphériques, solides, de taille comprise entre 20 et 60 µm. Les microcapsules sont intactes après 4 mois de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 8 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées

*a) Préparation de la phase aqueuse :*

- 5                    On disperse 0,75 g de farine de lupin (*Farine ultra-fine de lupin blanc doux* (CANA) à 45% de protéines) dans 15 ml de tampon acétate pH 7,4, porté à la température de 35°C. On agite sous agitation magnétique pendant 15 min, puis on centrifuge et on sépare le surnageant.

10    *b) Emulsification*

On disperse 6 ml du surnageant dans 30 ml de cocoate d'éthyl 2 hexyle à 2% de sorbitan trioleate (Span 85®) par agitation de 5 min à 2000 rpm.

*c) Réticulation*

- 15                    On procède pour la réticulation comme décrit à l'exemple 1.  
On obtient des microcapsules de taille comprise entre 20 et 60 µm, parfaitement sphériques.  
Elles résistent plus de 14 semaines à une température de 45°C, à l'état de suspension aqueuse.

- 20                    *Essai de lyse dans la trypsine* : 250 mg de microcapsules humides sont introduits dans un tube contenant 7,5 ml d'une solution à 0,4 % de trypsine (type II-S, from porcine pancreas, Sigma) dans un tampon de pH 7,5. Le tube est incubé à 37°C et une agitation magnétique est installée. La lyse est suivie par examen  
25                    microscopique jusqu'à disparition complète des microcapsules.

Résultat : les microcapsules ont complètement disparu après 20 min.

- Exemple 9 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de lupin réticulées contenant un principe actif hydrosoluble.

*a) Préparation de la phase aqueuse :*

On disperse 0,75 g de farine de lupin (*Farine ultra-fine de lupin blanc doux* (CANA) à 45% de protéines) dans 15 ml de tampon succinate pH 6 porté à la température de 35°C. On installe une agitation magnétique de 15 min, puis on

centrifuge et on sépare le surnageant. On dissout du glucose dans le surnageant à la concentration de 3%.

On opère ensuite pour l'émulsification et la réticulation comme décrit à l'exemple 8.

- 5 Les microcapsules sont séparées par centrifugation puis lavées plusieurs fois avec le cocoate d'éthyl hexyle. On obtient des microcapsules parfaitement formées, de taille comprise entre 20 et 70  $\mu\text{m}$ , contenant du glucose.

- 10 Exemple 10 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de pois réticulées

Le protocole décrit à l'exemple 8 est reproduit en remplaçant la farine de lupin par un isolat de protéines de Pois (à 90% de protéines : Pisane HD®, Cosucra), et en remplaçant le tampon acétate pH 7,4 par un tampon succinate de pH 6.

- 15 On obtient des microcapsules sphériques de taille comprise entre 10 et 60  $\mu\text{m}$ , qui résistent plus de 8 semaines à une température de 45°C, à l'état de suspension aqueuse. Ces microcapsules sont lysées dans la trypsine, dans les conditions décrites à l'exemple 8, en 8 min.

- 20 Exemple 11 de l'invention : Microcapsules à paroi formée de protéines de fève réticulées

- 25 Le protocole décrit à l'exemple 8 est reproduit en remplaçant la farine de lupin par un concentrat de protéines de Fève (à 50% de protéines : Concentrat 50®, Gemef Industrie). On obtient des microcapsules sphériques de taille comprise entre 10 et 50  $\mu\text{m}$ , qui résistent plus de 8 semaines à une température de 45°C, à l'état de suspension aqueuse. Les microcapsules sont lysées dans la trypsine, dans les conditions décrites à l'exemple 8, en 75 min.

- 30 Exemple 12 de l'invention : Microcapsules de protéines de fève réticulées, de grande taille

- 35 Le protocole décrit à l'exemple 11 est reproduit en remplaçant le tampon acétate par le tampon citrate pH 6, en supprimant l'addition de trioléate de sorbitane et en diminuant la vitesse d'agitation à 600 rpm. On obtient un volumineux sédiment de capsules opaques, visibles à l'oeil nu, et sédimentant rapidement.

L'analyse de taille de 300 capsules, effectuée au microscope avec un oculaire muni d'une échelle micrométrique, donne une marge de taille comprise entre 217 et 1643  $\mu\text{m}$ , avec un diamètre moyen de 735  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 18% de microcapsules de taille supérieure au mm.

- 5 On observe que la membrane des microcapsules est élastique et solide: si on exerce une pression sur la lamelle d'observation microscopique, le diamètre des microcapsules augmente pendant que s'exerce la pression, pour reprendre sa valeur initiale lorsque la pression cesse.

- 10 Les microcapsules sont intactes après 7 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

Exemple 13 de l'invention : Microcapsules de protéines de féverole réticulées : augmentation de la taille par addition d'oxyde de titane à la phase hydrophobe.

- 15 Le protocole décrit à l'exemple 12 est reproduit en dispersant 0,1% d'oxyde de titane dans la phase huileuse, avant l'émulsification. On obtient des microcapsules à membrane solide et élastique, sédimentant rapidement.

L'analyse de taille, effectuée comme à l'exemple 12 donne une marge de taille de 217 à 2170  $\mu\text{m}$ , avec un diamètre moyen de 899  $\mu\text{m}$  et une proportion de 43 % de microcapsules de taille supérieure au mm.

- 20 Cet exemple démontre que l'addition d'oxyde de titane à la phase huileuse permet d'augmenter de manière importante le diamètre moyen des microcapsules et la proportion de microcapsules de taille supérieure au mm.

- 25 Exemple 14 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées : augmentation de la taille par addition de colorant Red DC 30 à la phase aqueuse.

- 30 Le protocole décrit à l'exemple 8 est reproduit, en remplaçant le tampon acétate par le tampon succinate pH 6, en dispersant dans la phase aqueuse 0,1% du pigment rouge Red DC 30, en supprimant le trioléate de sorbitane, et en diminuant la vitesse d'agitation à 600 rpm. On obtient un sédiment formé de vésicules de couleur rouge, sphériques. On observe que la membrane est élastique et solide : si on exerce une pression sur la lamelle d'observation microscopique, le diamètre des microcapsules augmente pendant que s'exerce la pression, pour reprendre sa valeur initiale lorsque la pression cesse.

Les microcapsules sont intactes après 3 mois de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse. Ces microcapsules sont lysées par la trypsine en 12 min, dans les conditions décrites à l'exemple 8.

5 L'analyse de taille, effectuée comme à l'exemple 12, donne une marge de taille de 186 à 1240  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 632  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 6% de microcapsules de taille supérieure au  $\mu\text{m}$ .

10 Un essai comparatif effectué dans des conditions identiques mais en omettant l'addition du pigment rouge Red DC 30, donne des microcapsules de diamètre très nettement inférieur, avec une marge de taille de 150 à 800  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 322  $\mu\text{m}$ , et aucune capsule de diamètre supérieur au  $\mu\text{m}$ .

Exemple 15 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille obtenues avec addition de laque d'indigocarmin à la phase aqueuse.

15 Le protocole décrit à l'exemple 14 est reproduit en remplaçant le pigment Red DC 30 par la laque : indigocarmin aluminium lake (Colorcon). On obtient des microcapsules colorées en bleu à membrane solide et élastique. Les microcapsules sont intactes après 5 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

20 L'analyse de taille donne une marge de taille de 217 à 1023  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 536  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 0,3 % de microcapsules de taille supérieure au  $\mu\text{m}$ .

Exemple N°16 : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille, obtenues avec addition de stéarate de calcium à la phase aqueuse

25 Le protocole décrit à l'exemple 14 est reproduit en remplaçant le pigment Red DC 30 par du stéarate de calcium. On obtient des microcapsules blanches qui restent intactes après 3 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

30 L'analyse de taille donne une marge de taille de 279 à 1240  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 679  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 7 % de microcapsules de taille supérieure au  $\mu\text{m}$ .

Exemple 17 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille obtenues avec addition de talc à la phase aqueuse

Le protocole décrit à l'exemple 14 est reproduit en remplaçant le pigment Red DC 30 par du talc. On obtient des microcapsules blanches qui restent intactes après 7 semaines de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

L'analyse de taille donne une marge de taille de 217 à 1147  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 666  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 5 % de microcapsules de taille supérieure au mm.

10

Exemple 18 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille obtenues avec addition d'oxyde de titane à la phase aqueuse.

Le protocole décrit à l'exemple 14 est reproduit en remplaçant le pigment Red DC 30 par de l'oxyde de titane. On obtient des microcapsules blanches. L'analyse de taille, effectuée comme à l'exemple 12, donne une marge de taille de 248 à 1271  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 620  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 2 % de microcapsules de taille supérieure au mm.

Exemple 19 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille obtenues avec addition d'oxyde de titane à la phase hydrophobe

Le protocole décrit à l'exemple 18 est reproduit, en incorporant l'oxyde de titane, non pas à la phase aqueuse mais à la phase hydrophobe, et en l'utilisant à la concentration de 0,05%. On obtient des microcapsules blanches. L'analyse de taille donne une marge de taille de 155 à 1674  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 679  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 17 % de microcapsules de taille supérieure au mm.

Exemple N°20 : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille obtenues avec addition d'oxyde de titane à la phase hydrophobe

Le protocole décrit à l'exemple 19 est reproduit, en utilisant l'oxyde de titane à la concentration de 0,1%. On obtient des microcapsules blanches. L'analyse de taille donne une marge de taille de 217 à 1860  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 852  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 37% de microcapsules de taille supérieure au mm.

Exemple 21 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées de grande taille obtenues avec addition d'oxyde de titane à la phase aqueuse et à la phase hydrophobe

Le protocole décrit à l'exemple 20 est reproduit, en incorporant l'oxyde de titane à la concentration de 0,05% à la phase aqueuse, et 0,05% à la phase hydrophobe.

On obtient des microcapsules blanches. L'analyse de taille donne une marge de taille de 248 à 1798  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 825  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 26 % de microcapsules de taille supérieure au  $\mu\text{m}$ .

Exemple 22 de l'invention : Microcapsules de protéines de pois réticulées de grande taille obtenues avec addition d'oxyde de titane à la phase hydrophobe

Le protocole décrit à l'exemple 10 est reproduit, en supprimant le trioléate de sorbitane, en diminuant la vitesse d'agitation à 1000 rpm, et en incorporant de l'oxyde de titane à la phase hydrophobe à la concentration de 0,1%. On obtient des microcapsules blanches. L'analyse de taille donne une marge de taille de 124 à 1147  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 565  $\mu\text{m}$ , et une proportion de 6 % de microcapsules de taille supérieure au  $\mu\text{m}$ .

Un essai comparatif effectué dans des conditions identiques mais en omettant l'addition de l'oxyde de titane donne des microcapsules de diamètre très nettement inférieur, avec une marge de taille de 124 à 868  $\mu\text{m}$ , un diamètre moyen de 345  $\mu\text{m}$ , et aucune capsule de diamètre supérieur au  $\mu\text{m}$ .

Exemple 23 de l'invention : Microcapsules de protéines de lupin réticulées à contenu huileux.

*- Préparation de la phase aqueuse :*

On disperse 2 g de farine de lupin dans 40 ml de tampon succinate pH 6, porté à la température de 35°C. On agite sous agitation magnétique pendant 15 min, puis on centrifuge et on sépare le surnageant.

*- Préparation de la phase huileuse :*

On ajoute à 6 ml d'huile de paraffine fluide, 0,3 ml de chlorure de sébacoyl.

- *Emulsification-réticulation:*

On disperse la phase huileuse dans 30 ml de la phase aqueuse par agitation à 5000 rpm, et on laisse se développer la réaction de réticulation pendant 60 min. Les microcapsules sont ensuite lavées plusieurs fois à l'eau distillée.

- 5 On obtient un surnageant formé de microcapsules bien formées, sphériques, de taille 10-150  $\mu\text{m}$ . Toute l'huile est encapsulée. Les microcapsules sont intactes après 3 mois de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

- 10 Exemple 24 de l'invention : Microcapsules de protéines de féverole réticulées à contenu huileux

Le protocole décrit à l'exemple 23 est appliqué, en remplaçant la farine de lupin par la préparation de protéines de féverole : Concentrat 50®, et en utilisant le tampon acétate de pH 7,4 au lieu du tampon succinate de pH 6. On

- 15 obtient un surnageant formé de microcapsules bien formées, de taille 30-150  $\mu\text{m}$ . Toute l'huile est encapsulée.

Les microcapsules sont intactes après 2 mois de conservation à l'étuve à 45°C à l'état de suspension aqueuse.

- 20 Exemple 25 de l'invention : Microcapsules préparées à partir de lait de soja

*a) Préparation de la phase aqueuse :*

On dissout 1 g d'acétate de sodium trihydrate dans 1 ml d'eau distillée et on mélange cette solution avec 10 ml de lait de soja Bjorg® (Distriborg).

- 25 *b) Emulsification*

On disperse 6 ml de phase aqueuse dans 30 ml de cyclohexane à 2% de sorbitan trioléate, par agitation de 5 min à 2000 rpm.

*c) Réticulation*

- 30 On ajoute 40 ml d'une solution de chlorure de téréphtaloyle à 5% (p/v) dans un mélange de chloroforme : cyclohexane (1:4 v/v). Après agitation de 30 min, les microcapsules sont séparées par centrifugation puis lavées comme décrit à l'exemple 1.

On obtient après centrifugation un important sédiment blanc crème.

- 35 L'examen microscopique montre de belles microcapsules sphériques, à contenu

finement piqueté, à membrane nette, de taille : 10-70  $\mu\text{m}$ . Incubées à l'étuve à 45°C, les microcapsules sont intactes après un an de conservation à l'état de suspension aqueuse, après 8 mois et demi à l'état de suspension dans un gel de carbopol ou de xanthane, ou dans des huiles de silicone ou d'arachide gélifiées, ou  
5 dans une microémulsion lipidique gélifiée.

Des études toxicologiques ont été réalisées et font l'objet de l'exemple 43.

Exemple 26 de l'invention : Préparation de microcapsules à partir de lait de soja

10 Le protocole décrit à l'exemple 25 est appliqué en remplaçant le lait de soja BJORG par du lait de soja CEREAL®. On obtient des microcapsules sphériques de taille 10-60  $\mu\text{m}$ , intactes après 5 mois et demi de séjour à l'étuve à 45°C, à l'état de suspension aqueuse.

15 Exemple 27 de l'invention : Préparation de microcapsules à partir de lait de soja

Le protocole décrit à l'exemple 25 est appliqué en remplaçant le lait de soja BJORG par du lait de soja GAYLORD HAUSER®. On obtient des microcapsules sphériques de taille 10-70  $\mu\text{m}$ , intactes après 5 mois et demi de séjour à l'étuve à 45°C, à l'état de suspension aqueuse.

20

Exemple 28 de l'invention : Préparation de microcapsules à partir de lait de soja

Le protocole décrit à l'exemple 25 est reproduit en remplaçant l'acétate de sodium par du citrate de sodium dihydrate ajouté à raison de 0,65g pour 1 ml d'eau, en dispersant dans la phase aqueuse préalablement portée à la température  
25 de 35°C, 0,1% d'oxyde de titane, en remplaçant le cyclohexane par du cocoate d'éthyl 2 hexyle, en supprimant l'addition de sorbitan trioléate, et en abaissant la vitesse d'agitation à 600 rpm.

On obtient un volumineux sédiment blanc formé de belles microcapsules à membrane solide et élastique, de taille 100 à 900  $\mu\text{m}$ .

30

Exemple 29 de l'invention : Microcapsules préparées à partir de lait de soja et contenant une émulsion d'huile

35

*a) Préparation de la phase aqueuse :*

On dissout 2 g d'acétate de sodium trihydrate dans 2ml d'eau distillée et on mélange cette solution avec 20 ml de lait de soja Bjorg®.

5 *b) Première émulsification : Huile/Eau*

On disperse 5 ml d'huile de paraffine fluide dans 15 ml de la phase aqueuse précédente par agitation de 5 min à 5000 rpm.

*c) Deuxième émulsification : Eau/Huile*

10 On prélève 6 ml de l'émulsion précédente et on les disperse dans 30 ml de cocoate d'éthyl 2 hexyle à 1 % de sorbitan trioleate par agitation de 5 min à 1200 rpm.

*d) Réticulation*

15 On ajoute 40 ml d'une solution de chlorure de téréphtaloyle à 5% (p/v) dans le cocoate. Après agitation de 30 min, les microcapsules sont séparées par centrifugation puis lavées comme décrit à l'exemple 1.

On obtient des microcapsules de taille 10-100 µm renfermant des gouttelettes réfringentes d'huile de paraffine.

20

Exemple 30 de l'invention : Préparation de microcapsules à contenu huileux à partir de lait de soja

*a) Préparation de la phase aqueuse :*

25 On dissout 5 g d'acétate de sodium trihydrate dans 5 ml d'eau distillée et on mélange cette solution avec 50 ml de lait de soja Bjorg®.

*b) Préparation de la phase huileuse :*

30 On ajoute à 12 ml d'huile de paraffine fluide, 0,6 ml de chlorure de sébacoyl.

*c) Emulsification-réticulation :*

On disperse la phase huileuse dans la phase aqueuse par agitation à 5000 rpm, et on laisse se développer la réaction de réticulation pendant 60 min.

35 Les microcapsules sont ensuite lavées plusieurs fois à l'eau distillée.

On obtient un surnageant de couleur crème formé de microcapsules bien formées, sphériques, de taille 100-200  $\mu\text{m}$ . Toute l'huile est encapsulée.

Incubées à l'étuve à 45°C, les microcapsules sont intactes après 8 mois de conservation à l'état de suspension aqueuse, après 2 mois et demi à l'état de suspension dans des huiles de silicone ou d'arachide gélifiées.

Exemple 31 de l'invention : Préparation de nanocapsules à paroi en protéines végétales

10 a) Fabrication de la solution de protéines végétales nécessaire à la fabrication des nanocapsules

200 g de farine de lupin sont dispersés dans 4 l de tampon succinate pH 6 porté à température de 35°C. Après agitation magnétique pendant 15 min, la solution est centrifugée et le surnageant récupéré. Il est utilisé pour les étapes ultérieures.

15 b) Préparation de la phase huileuse

30 ml de chlorure de sébacoyl sont ajoutés à 100 ml d'huile de paraffine fluide. Le mélange est effectué à température ambiante et la solution homogène est utilisée pour les étapes ultérieures.

20 c) Emulsification/réticulation

Les solutions préparées en a) et b) sont additionnées en continu et envoyées dans un homogénéisateur haute pression à une pression d'homogénéisation comprise entre 300 et 1 200 bars, par exemple 800 bars. Les nanocapsules obtenues sont de tailles inférieures à 1 micron, sont remarquablement stables et sont utilisables dans un grand nombre de formulations cosmétiques, y compris les formulations cosmétiques hydratées, sans problème de dégradation au cours du temps. Elles sont visualisées comme étant intactes après un mois de conservation à l'étuve à 45°C.

30 Exemple 32 de l'invention :

Les 100 ml d'huile de paraffine fluide utilisés dans l'exemple 31-b) peuvent être remplacés avantageusement par une quantité comprise entre 100 et 500 ml d'huile de paraffine fluide.

35

Exemple 33 de l'invention :

Les 100 ml d'huile de paraffine fluide utilisés dans l'exemple 31-b) peuvent être remplacés avantageusement par : 100 ml de myristate d'éthyle ou 100 ml de myristate d'isopropyle, ou 100 ml d'oléate d'éthyle, ou 100 ml d'acétate de vitamine E, ou 100 ml de palmitate de vitamine A ou 100 ml de benzoate de benzyle. Tout autre actif huileux ou huile végétale ou combinaison de ces dernières peuvent également être encapsulés de cette même façon.

Exemple 34 de l'invention :

Il est possible de remplacer la phase a) de l'exemple 31 par la préparation suivante : 200 g de concentrat de protéines de féverole, dispersés dans 4 l de tampon acétate pH 7,4. Après mélange et chauffage léger pendant 15 min à 35°C, la solution est centrifugée et le surnageant est utilisé pour la suite du procédé.

Exemple 35 de l'invention :

Préparation de nanosphères à paroi en protéines végétales

a) Fabrication du mélange nécessaire à la fabrication des nanosphères

75 g de farine de lupin (farine ultra-fine de lupin blanc doux, (CANA) à 45 % de protéines) sont dispersés dans 1,5 l de tampon acétate pH 7,4. Après agitation à température ambiante pendant 10 min, la solution est centrifugée et le surnageant est utilisé pour la suite du procédé.

b) Préparation de l'agent réticulant

400 g de chlorure de téréphtaloyle sont broyés dans un mortier et sont rajoutés à un litre de vaseline visqueuse CODEX. L'ensemble est agité par agitation mécanique.

c) Emulsification

6 l d'huile de vaseline visqueuse CODEX (indice de viscosité : 250 centipoises) sont introduits dans une cuve sous agitation et 320 ml d'un tensioactif, (par exemple : le glycérol sorbitan hydroxyisostéarate ARLACEL 780, ICI) sont rajoutés à l'ensemble. L'ensemble est agité pendant quelques minutes. 1 kg de la solution telle que préparée en a) est alors introduit sous agitation,

l'émulsification étant réalisée en quelques minutes à 20 000 rpm à l'aide d'un Ultra-Turax.

d) Réticulation

- 5 La solution contenant l'agent réticulant préparée à l'étape b) est alors introduite dans l'émulsion, les particules solides présentes dans celle-ci sont alors rajoutées également et se dissoudront au cours du temps. Après 5 min d'agitation à 20 000 rpm à l'aide de l'Ultra-Turax, la solution est mise sous agitation mécanique à vitesse de rotation réduite pendant 18 h au moins à température ambiante. Les  
10 nanosphères sont séparées par centrifugation en discontinu et le surnageant est éliminé (4 000 rpm pendant 15 min).

e) Lavage

- 15 Les nanosphères sont lavées par des lavages successifs réalisés à l'aide d'une phase organique miscible avec l'huile de vaseline. Citons pour l'exemple le DRAGOXAT® (DRAGOCO), le myristate d'isopropyl (STEARINERIE DUBOIS) et des triglycérides à chaîne moyenne (STEARINERIE DUBOIS). Au cours de chaque lavage, 100 ml de nanocapsules sont rajoutés à 500 ml de phase organique. L'ensemble est agité pendant quelques minutes puis centrifugé (4 000 rpm pendant  
20 15 mn). Les nanosphères obtenues peuvent être mises en suspension, par exemple dans des gels de protéine ou de polysaccharides, dans une phase huileuse, ou dans un gel de polymères carboxyvinyles (carbomer).

Exemple 36 de l'invention :

- 25 Préparation de nanosphères contenant un principe actif hydrosoluble ou insoluble
- On procède comme décrit à l'exemple 35, si ce n'est qu'à la solution fabriquée en a), on peut rajouter de nombreux principes actifs, par exemple : du glucose, un acide aminé tels que la glutamine, la sérine, la glycine, la cystéine, les principes actifs tels que la caféine, la théophylline, les extraits de plante comme  
30 les extraits de ginkgo biloba, de centella asiatica, de marron d'inde.

Exemple 37 de l'invention :

On procède comme décrit à l'exemple 36. Cependant la préparation de la phase telle que décrite en a) est modifiée de la façon suivante :

37-A) Remplacement du tampon acétate pH 7,4 par un tampon acétate pH 6,8.

37-B) Remplacement du tampon acétate pH 7,4 par un tampon acétate pH 5,9.

5 37-C) Remplacement du tampon acétate pH 7,4 par un tampon succinate pH 6.

37-D) Remplacement du tampon acétate pH 7,4 par un tampon citrate pH 6.

10 37-E) Remplacement de la farine de lupin par un isolat de protéines de pois.

37-F) Remplacement de la farine de lupin par un concentrat de protéines de féverole (à 50 % de protéines : Concentrat 50<sup>®</sup> de GEMEF INDUSTRIE).

15 Exemple 38 de l'invention :

Emulsion eau-dans-huile à usage cosmétique ou pharmaceutique

Utilisation des microparticules ou nanoparticules dans des formulations de type émulsion eau-dans-huile

20 Formulation 38-A

25	A   Eau	qsp 100
	Butylene Glycol	2
	Glycerine	3
	Sodium Dihydroxycetyl Phosphate,	2
	Isopropyl Hydroxycetyl Ether	
30	B   Glycol Stearate SE	14
	Triisononanoïn	5
	Octyl Cocoate	6
35	C   Butylene Glycol,	2
	Methylparaben,	
	Ethylparaben,	
	Propylparaben.	

| pH ajusté à 5,5

D | Produits de l'invention 0,01 - 10 %.

5 Formulation 38-B

	A   Eau	qsp 100
	Butylene Glycol	2
	Glycerine	3
10	Polyacrylamide,	2,8
	Isoparaffin.	
	Laureth-7	
	B   Butylene Glycol	2
15	Methylparaben.	
	Ethylparaben.	
	Propylparaben	
	Phenoxyethanol,	0,5
20	Methylparaben,	
	Propylparaben,	
	Butylparaben.	
	Ethylparaben	
25	Butylene Glycol	0,5

C | Produits de l'invention 0,01 - 10 %

Formulation 38-C

30	A   Carbomer	0,50
	Propylene Glycol	3,00
	Glycerol	5,00
	Eau	qsp 100
35		

	B	Octyl Cocoate	5,00
		Bisabolol	0,30
		Dimethicone	0,30
5	C	Sodium Hydroxide	1,60
10	D	Phenoxyethanol	0,50
		Methylparaben,	
		Ethylparaben,	
		Propylparaben,	
		Butylparaben	
		Parfum	0,3
15	E	Produit de l'invention	0,01 - 10 %.

Exemple 39 de l'invention :

Emulsion huile-dans-eau à usage cosmétique ou pharmaceutique

Utilisation des microparticules et des nanoparticules dans une formulation de type  
huile-dans-eau

20	A	PEG 30-dipolyhydroxystearate	3
		Capric Triglycerides	3
		Cetearyl Octanoate	4
		Dibutyl Adipate	3
25		Grape Seed Oil	1,5
		Jobba Oil	1,5
		Phenoxyethanol,	0,5
30		Methylparaben,	
		Ethylparaben,	
		Propylparaben,	
		Butylparaben	
35	B	Glycerine	3
		Butylene Glycol	3
		Magnesium Sulfate	0,5

		EDTA	0,05
		Eau	qsp 100
5	C	Cyclomethicone	1
		Dimethicone	1
	D	Parfum	0,3
10	E	Produit de l'invention	0,01 - 10 %
Exemple 40 de l'invention :			
Composition cosmétique			
Utilisation des microparticules et des nanoparticules dans une formulation de type			
shampooing ou gel douche			
15	A	Xanthan Gum	0,8
		Eau	qsp 100
20	B	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben,	
		Ethylparaben,	
		Propylparaben,	
		Butylparaben	
25		Butylene Glycol	0,5
		Methylparaben,	
		Ethylparaben,	
		Propylparaben	
30	C	Citric acid	0,8
	D	Sodium Laureth Sulfate	40,0
35	E	Produit de l'invention	0,01 - 10 %

Exemple 41 de l'invention :

Composition cosmétique

Utilisation des microparticules et des nanoparticules dans une formulation de type rouge à lèvres et autres produits anhydres

5	A	Mineral Wax	17,0
		Isostearyl Isostéarate	31,5
		Propylene Glycol Dipelargonate	2,6
		Propylene Glycol Isostearate	1,7
		PEG 8 Beeswax	3,0
10		Hydrogenated Palm Kernel Oil	3,4
		Glycerides, Hydrogenated Palm	
		Glyceride	
		Lanoline Oil	3,4
15		Sesame Oil	1,7
		Tribehenin	1,7
		Cetyl Lactate	1,7
		Mineral Oil, Lanolin Alcohol	3,0
20	B	Castor Oil	qsp 100
		Titanium Dioxide	3,9
		CI 15850:1	0,616
		CI 45410:1	0,256
		CI 19140:1	0,048
25		CI 77491	2,048
	C	Produit de l'invention	0,01 - 5

Exemple 42 de l'invention :

30 Composition cosmétique

Utilisation des microparticules et des nanoparticules dans une formulation de gels aqueux (contours de l'oeil, amincissants, etc.)

35 Eau qsp 100

	Carbomer	0,5
	Butylene Glycol	15
5	Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben	0,5
10	Produit de l'invention	0,01 - 10

Exemple 43 de l'invention :

Etudes toxicologiques réalisées sur les produits de l'exemple 25 de l'invention

15 a) Toxicité orale

Les tests ont été effectués en suivant le protocole en accord avec la ligne directrice de l'OCDE concernant l'étude de la toxicité orale aiguë (n°401 du 24 février 1987) à des doses maximales de 5 g/kg de poids corporel et n'ont provoqué aucune lésion macroscopique pouvant être rapportée à un effet toxique du produit.

Les produits de l'invention (microcapsules de soja) tels qu'obtenus à l'exemple 25 sont utilisés oralement en dose inférieure à 5 g/kg et présentent donc une toxicité nulle.

25 b) Irritation oculaire

Les tests ont été effectués selon la méthode officielle définie par l'arrêté du 3 mai 1990 (Journal Officiel de la République Française du 14 novembre 1990) avec le produit de l'invention (microcapsules de soja) et n'ont provoqué aucune lésion de l'iris ou de la cornée.

Les produits de l'invention (microcapsules de soja) instillés purs sont apparus non irritants et la tolérance oculaire peut être considérée comme très bonne.

## c) Irritation cutanée

Les tests ont été effectués selon la méthode officielle définie par l'arrêté du 1<sup>er</sup> février 1982 (Journal Officiel de la République Française du 21 février 1982) avec le produit de l'invention (microcapsules de soja) et n'ont  
5 provoqué aucun phénomène irritatif.

Les produits de l'invention (microcapsules de soja) instillés purs sont apparus non irritants et la tolérance cutanée peut être considérée comme excellente.

## 10 d) Recherche du pouvoir sensibilisant

Des tests de maximisation ont été réalisés selon un protocole adapté de la méthode décrite par MAGNUSSON et KLIGMAN (J. INVEST. DERM. 1969, 52, 268-276).

Les produits de l'invention (microcapsules de soja) n'ont provoqué  
15 aucune réaction macroscopique significative d'une réaction de sensibilisation. Ils peuvent donc être considérés comme hypoallergéniques (classe I).

## REVENDEICATIONS

1. Particules, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins en surface, une paroi formée de protéines végétales réticulées, en particulier au moyen d'une réticulation interfaciale entre les protéines végétales et un agent réticulant polyfonctionnel acylant, comprenant au moins deux groupes acylants, réalisant des liaisons covalentes entre les fonctions acylables des protéines et les groupements acyles de l'agent réticulant polyfonctionnel acylant.

2. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que les protéines végétales précitées sont extraites notamment de légumineuses, en particulier des plantes suivantes : lupin (genre *Lupinus*), soja (genre *Glycine*), pois (genre *Pisum*), pois chiche (*Cicer*), de la luzerne (*Medicago*), féverole (*Vicia*), lentille (*Lens*), haricot (*Phaseolus*), du colza (*Brassica*), ou du tournesol (*Helianthus*), ou encore de céréales comme le blé, le maïs, l'orge, le malt, l'avoine.

3. Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que les protéines végétales précitées sont utilisées sous forme de préparations pulvérulentes telles que des farines, des concentrats, des isolats, ou de préparations liquides telles que des laits de soja.

4. Particules selon la revendication 3, caractérisées en ce que les protéines végétales sont dissoutes, à une concentration en poids comprise entre 0,5 et 5 % dans une solution aqueuse de pH compris entre environ 4,5 et environ 8.

5. Particules selon la revendication 4 caractérisées en ce que la solution aqueuse de protéine végétale de pH compris entre environ 4,5 et environ 8 renferme au moins un sel d'acide carboxylique à une concentration en poids comprise entre 0,1 et 20 %.

6. Particules selon la revendication 5 caractérisée en ce que le sel d'acide carboxylique est un sel alcalin ou alcalino-terreux d'un acide carboxylique choisi parmi le groupe consistant de l'acide acétique, oxalique, malonique, succinique, glutarique, diméthylglutarique, adipique, fumarique, maléique, tartrique, malique, citrique, lactique, et l'acide salicylique.

7. Particules selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles contiennent une substance insoluble lipophile, en particulier choisie parmi le groupe consistant des sels insolubles d'acides gras et de métaux bivalents comme le stéarate de calcium ou de magnésium, des oxydes métalliques tels que l'oxyde de titane, l'oxyde de zinc, ou du talc, ou des substances colorées insolubles

sous forme de pigments ou sous la forme de laques de calcium, d'aluminium, de baryum ou de zirconium de divers colorants.

8. Particules selon la revendication 7, caractérisées en ce que les sels insolubles d'acides gras précités sont choisis parmi le groupe consistant des sels de calcium, magnésium, strontium, baryum, d'acides carboxyliques à nombre de carbones égal ou supérieur à 12, tels que les acides laurique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique, et les laques précitées sont choisies parmi le groupe consistant de l'indigocarmine aluminium lake (de couleur bleue), le Ponceau 4 R aluminium lake (rouge), le Sunset yellow FCF aluminium lake (orange).

9. Particules selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce que l'agent réticulant polyfonctionnel acylant précité est constitué par un dihalogénure d'acide ou un dianhydride d'acide.

10. Particules selon la revendication 9, caractérisées en ce que le dihalogénure d'acide est choisi parmi le dihalogénure de phtaloyle, de téréphtaloyle, de sébacoyale, de glutaryle, d'adipoyle ou de succinyle.

11. Particules selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles contiennent un principe actif cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire tel que huile végétale, minérale ou synthétique, des dérivés de vitamine A et de vitamine E, des principes actifs hydrophiles tels que des extraits végétaux, l'acide ascorbique ou vitamine C, PMG, glucose, des pigments organiques et des pigments minéraux.

12. Particules selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles ont une taille comprise entre environ 10 nanomètres et environ 3 millimètres.

13. Utilisation des particules selon l'une quelconque des revendications précédentes pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmaceutique et notamment dermatologique, ou alimentaire.

14. Composition cosmétique, pharmaceutique, notamment dermatologique ou alimentaire, contenant des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

15. Procédé de fabrication de particules de protéines végétales réticulées, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la formation d'une solution aqueuse de pH compris entre environ 4,5 et environ 8 contenant en solution au moins une protéine végétale et au moins un sel d'acide carboxylique ;
- b) la formation d'une phase huileuse ;
- 5 c) la formation d'une émulsion par mélange sous agitation de la phase aqueuse et de la phase huileuse ci-dessus ;
- d) la réticulation interfaciale de ladite protéine végétale à l'aide d'un agent réticulant polyfonctionnel acylant à au moins deux groupes acylants pendant une période de temps suffisante pour obtenir des particules comprenant au moins
- 10 en surface des parois formées de protéines végétales réticulées par ledit agent réticulant ; et
- e) si désiré, la séparation des particules ainsi préparées.
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la concentration en poids de la protéine végétale dans la phase aqueuse est comprise
- 15 entre environ 0,5 et environ 5 %.
17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que la solution aqueuse précitée à pH compris entre environ 4,5 et environ 8 renferme une quantité d'un sel d'acide carboxylique comprise généralement entre environ 0,1 et 20 % en poids.
- 20 18. Procédé selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisé en ce que l'agent réticulant polyfonctionnel précité est choisi parmi un dihalogénure d'acide ou un dianhydride d'acide.
19. Procédé selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisé en ce que le rapport du poids de l'agent réticulant polyfonctionnel précité au poids de
- 25 protéine végétale utilisée est compris généralement entre 0,03 et 70 parties en poids d'agent réticulant pour une partie en poids de protéines.
20. Procédé selon l'une des revendications 15 à 19, caractérisé en ce qu'on utilise pour former la phase huileuse soit un solvant organique qui peut être facilement éliminé tel que le cyclohexane ou un mélange
- 30 chloroforme/cyclohexane en particulier à un rapport 1:4 v/v, soit de préférence une huile biocompatible, en particulier une huile végétale biocompatible, telle qu'une huile de coco, ou le cocoate d'éthyle-2-hexyle, ou une huile de paraffine.
21. Procédé selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce qu'on réalise un procédé en émulsion de type eau-dans-huile.

22. Procédé selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce qu'on réalise un procédé en émulsion de type huile-dans-eau.

23. Procédé selon l'une des revendications 15 à 22, caractérisé en ce qu'on utilise un agent tensioactif pour faciliter ou stabiliser l'émulsion, de préférence un tensioactif de type sorbitan, tel que le sorbitan trioléate.

24. Procédé selon l'une des revendications 15 à 23, caractérisé en ce que, pour augmenter la taille des particules, on ajoute dans la phase aqueuse ou la phase hydrophobe ou à l'une et l'autre phase, une substance insoluble lipophile choisie de préférence parmi le groupe des sels insolubles d'acides gras et de métaux bivalents, du talc, des oxydes métalliques, ou des substances colorées insolubles sous forme de pigment ou sous la forme de laque.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que les sels insolubles d'acides gras et de métaux bivalents précités sont choisis parmi le groupe consistant des sels de calcium, magnésium, strontium, baryum, d'acides carboxyliques à nombre de carbones égal ou supérieur à 12, tels que les acides laurique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique, les oxydes métalliques précités sont choisis parmi le groupe consistant de l'oxyde de titane, l'oxyde de zinc, les substances colorées insolubles sont choisies parmi le groupe des pigments organiques tels que le DC Red 30 ou des laques choisies parmi des laques de calcium, d'aluminium, de baryum ou de zirconium de colorants, telles que l'indigocarmin aluminium lake de couleur bleue, le Ponceau 4R aluminium lake, rouge, ou le Sunset yellow FCF aluminium lake, orange.

26. Procédé selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce que la substance insoluble lipophile précitée est incorporée en une quantité comprise entre 0,01 % et 2 % en poids de la phase concernée.

27. Procédé selon l'une des revendications 15 à 26, caractérisé en ce que la réaction de réticulation interfaciale est réalisée à une température comprise entre 4 et 80°C, de préférence entre 15 et 30°C, et à pression atmosphérique.

28. Procédé selon l'une des revendications 15 à 27 caractérisée en ce que le sel d'acide carboxylique est un sel alcalin ou alcalino-terreux d'un acide carboxylique choisi parmi le groupe consistant de l'acide acétique, oxalique, malonique, succinique, glutarique, diméthylglutarique, adipique, fumarique, maléique, tartrique, malique, citrique, lactique, et l'acide salicylique.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01502

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 A61K9/16 A61K9/50 A61K9/51

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 14420 A (EMISPHERE TECHNOLOGIES INC., U.S.A.) 7 July 1994 see the whole document ---	1, 2, 10, 15
A	EP 0 381 543 A (BIOETICA) 8 August 1990 cited in the application see the whole document ---	1, 2, 10, 15
A	US 4 780 321 A (M.C. LEVY ET AL.) 25 October 1988 cited in the application see the whole document ---	1, 2, 10, 15
A	GB 2 040 863 A (MARS INC., U.S.A.) 3 September 1980 cited in the application see the whole document ---	1, 2, 10, 15
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 1998

Date of mailing of the international search report

06/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01502

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 95 33554 A (OMNITECHNIK  MIKROVERKAPSELUNGS-GMBH, DE)  14 December 1995  see the whole document  -----</p>	<p>1, 2, 10,  15</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9414420 A	07-07-1994	US 5401516 A	28-03-1995
		AU 6017194 A	19-07-1994
		AU 6668594 A	08-11-1994
		CA 2151818 A	07-07-1994
		CA 2160692 A	27-10-1994
		CN 1094611 A	09-11-1994
		EP 0674507 A	04-10-1995
		EP 0696192 A	14-02-1996
		JP 8507043 T	30-07-1996
		JP 8509231 T	01-10-1996
		MX 9400166 A	29-07-1994
		WO 9423702 A	27-10-1994
		US 5540939 A	30-07-1996
		ZA 9309608 A	24-08-1994
		ZW 17893 A	27-07-1994
EP 381543 A	08-08-1990	FR 2642329 A	03-08-1990
		AU 633866 B	11-02-1993
		AU 4886490 A	09-08-1990
		CA 2009065 A	31-07-1990
		DE 69001683 T	02-12-1993
		DK 381543 T	04-10-1993
		ES 2058827 T	01-11-1994
		JP 2229111 A	11-09-1990
		JP 2534921 B	18-09-1996
		US 5395620 A	07-03-1995
		US 5622656 A	22-04-1997
US 4780321 A	25-10-1988	FR 2527438 A	02-12-1983
		AT 23439 T	15-11-1986
		EP 0095968 A	07-12-1983
		JP 1742095 C	15-03-1993
		JP 4024091 B	24-04-1992
		JP 58214336 A	13-12-1983
GB 2040863 A	03-09-1980	CA 1148800 A	28-06-1983
		CY 1313 A	28-03-1986
		FR 2444497 A	18-07-1980
		HK 6186 A	07-02-1986
		JP 1632896 C	26-12-1991

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2040863 A		JP 2033414 B	27-07-1990
		JP 55109443 A	22-08-1980
		KE 3576 A	10-01-1986
		US 4569844 A	11-02-1986
WO 9533554 A	14-12-1995	DE 4419724 A	07-12-1995
		EP 0730493 A	11-09-1996
		JP 9501734 T	18-02-1997
		US 5690869 A	25-11-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 98/01502

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 A61K9/16 A61K9/50 A61K9/51		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 14420 A (EMISPHERE TECHNOLOGIES INC., U.S.A.) 7 juillet 1994 voir le document en entier ---	1, 2, 10, 15
A	EP 0 381 543 A (BIOETICA) 8 août 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1, 2, 10, 15
A	US 4 780 321 A (M.C. LEVY ET AL.) 25 octobre 1988 cité dans la demande voir le document en entier ---	1, 2, 10, 15
A	GB 2 040 863 A (MARS INC., U.S.A.) 3 septembre 1980 cité dans la demande voir le document en entier ---	1, 2, 10, 15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  30 octobre 1998		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  06/11/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Scarponi, U

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 98/01502

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 95 33554 A (OMNITECHNIK  MIKROVERKAPSELUNGS-GMBH, DE)  14 décembre 1995  voir le document en entier  -----</p>	<p>1, 2, 10,  15</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 98/01502

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9414420 A	07-07-1994	US 5401516 A	28-03-1995
		AU 6017194 A	19-07-1994
		AU 6668594 A	08-11-1994
		CA 2151818 A	07-07-1994
		CA 2160692 A	27-10-1994
		CN 1094611 A	09-11-1994
		EP 0674507 A	04-10-1995
		EP 0696192 A	14-02-1996
		JP 8507043 T	30-07-1996
		JP 8509231 T	01-10-1996
		MX 9400166 A	29-07-1994
		WO 9423702 A	27-10-1994
		US 5540939 A	30-07-1996
		ZA 9309608 A	24-08-1994
		ZW 17893 A	27-07-1994
EP 381543 A	08-08-1990	FR 2642329 A	03-08-1990
		AU 633866 B	11-02-1993
		AU 4886490 A	09-08-1990
		CA 2009065 A	31-07-1990
		DE 69001683 T	02-12-1993
		DK 381543 T	04-10-1993
		ES 2058827 T	01-11-1994
		JP 2229111 A	11-09-1990
		JP 2534921 B	18-09-1996
		US 5395620 A	07-03-1995
		US 5622656 A	22-04-1997
US 4780321 A	25-10-1988	FR 2527438 A	02-12-1983
		AT 23439 T	15-11-1986
		EP 0095968 A	07-12-1983
		JP 1742095 C	15-03-1993
		JP 4024091 B	24-04-1992
		JP 58214336 A	13-12-1983
GB 2040863 A	03-09-1980	CA 1148800 A	28-06-1983
		CY 1313 A	28-03-1986
		FR 2444497 A	18-07-1980
		HK 6186 A	07-02-1986
		JP 1632896 C	26-12-1991

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 98/01502

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2040863 A		JP 2033414 B	27-07-1990
		JP 55109443 A	22-08-1980
		KE 3576 A	10-01-1986
		US 4569844 A	11-02-1986
-----			
WO 9533554 A	14-12-1995	DE 4419724 A	07-12-1995
		EP 0730493 A	11-09-1996
		JP 9501734 T	18-02-1997
		US 5690869 A	25-11-1997
-----			